



PCT/CH 2004/000610

SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
CONFÉDÉRATION SUISSE
CONFEDERAZIONE SVIZZERA

REC'D 12 OCT 2004

WIPO

PCT

Bescheinigung

Die beiliegenden Akten stimmen mit den ursprünglichen technischen Unterlagen des auf der nächsten Seite bezeichneten Patentgesuches für die Schweiz und Liechtenstein überein. Die Schweiz und das Fürstentum Liechtenstein bilden ein einheitliches Schutzgebiet. Der Schutz kann deshalb nur für beide Länder gemeinsam beantragt werden.

Attestation

Les documents ci-joints sont conformes aux pièces techniques originales de la demande de brevet pour la Suisse et le Liechtenstein spécifiée à la page suivante. La Suisse et la Principauté de Liechtenstein constituent un territoire unitaire de protection. La protection ne peut donc être revendiquée que pour l'ensemble des deux Etats.

Attestazione

I documenti allegati sono conformi agli atti tecnici originali della domanda di brevetto per la Svizzera e il Liechtenstein specificata nella pagina seguente. La Svizzera e il Principato di Liechtenstein formano un unico territorio di protezione. La protezione può dunque essere rivendicata solamente per l'insieme dei due Stati.

Bern, 01. Okt. 2004

Eidgenössisches Institut für Geistiges Eigentum
Institut Fédéral de la Propriété Intellectuelle
Istituto Federale della Proprietà Intellettuale

Patentverfahren
Administration des brevets
Amministrazione dei brevetti

H. Jenni
Heinz Jenni

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY



Hinterlegungsbescheinigung zum Patentgesuch Nr. 01671/03 (Art. 46 Abs. 5 PatV)

Das Eidgenössische Institut für Geistiges Eigentum bescheinigt den Eingang des unten näher bezeichneten schweizerischen Patentgesuches.

Titel:

Verfahren zur in vitro Evolution von Polypeptiden.

Patentbewerber:

ETH Zürich
attn. ETH transfer
Rämistrasse 101
8092 Zürich

Anmeldedatum: 01.10.2003

Voraussichtliche Klassen: C12N

5 Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich

10

E1115-CH
Schweiz

15

Verfahren zur *in vitro* Evolution von Polypeptiden

20 Die vorliegende Erfindung betrifft gemäss dem Oberbegriff des unabhängigen Anspruchs 1 ein Verfahren zur Evolution von Polypeptiden, wobei der Prozess der Evolution vollständig *in vitro* stattfindet. Das Verfahren ermöglicht die Isolierung von Polypeptiden mit erwünschten Eigenschaften aus einer sehr grossen Sammlung von Polypeptid-Varianten.

25 Die Herstellung von Polypeptiden mit erwünschten Eigenschaften (zum Beispiel das Binden an ein spezifisches Molekül oder die Katalyse einer spezifischen chemischen Reaktion) ist von grossem kommerziellen Interesse. Polypeptide mit den erwünschten Eigenschaften müssen aus einer sehr grossen Anzahl von Polypeptid-Varianten identifiziert und isoliert werden. Der Prozess stellt eine Imitation
30 der natürlichen Evolution dar: In einem ersten Schritt wird eine grosse Anzahl von genetisch verschiedenen Polypeptid-Mutanten hergestellt. In einem zweiten Schritt werden die Polypeptid-Mutanten mit den vorteilhaften Eigenschaften selektiert. Der Prozess der Herstellung von Diversität und der Selektion kann belie-

big oft wiederholt werden. Während dem Prozess muss die genetische Information (Genotyp) mit dem Polypeptid (Phänotyp) physikalisch verbunden sein.

Mehrere Verfahren zur Selektion und Evolution von Polypeptiden sind bekannt.

- 5 Diese Verfahren verwenden unterschiedliche Strategien, um Geno- und Phänotyp einer Polypeptid-Bibliothek physikalisch aneinander zu koppeln:

Die sogenannte „Phage-Display“ Technologie wird erfolgreich zur Selektion von Polypeptiden mit erwünschten Bindungseigenschaften benutzt (für ein Review
10 siehe Clackson T. and Wells J.A. (1994). In vitro selection from protein and peptide libraries. *Trends Biotechnol.* 12(5) : 173-84). Filamentöse Phagenpartikel tragen die Polypeptide (Phänotyp) auf ihrer Oberfläche und die genetische Information (Genotyp) im Innern. Die physikalische Verknüpfung zwischen der Nukleinsäure (DNA) und dem Genprodukt (Protein) findet während der Produktion der
15 Phagenpartikel im Innern von bakteriellen Zellen statt. Ähnliche Technologien sind bekannt, bei denen die Träger des Phäno- und Genotyps an Stelle von Phagenpartikel, Hefezellen (Yeast Display) oder Bakterienzellen (Bacterial Cell Display) sind. Bei all diesen Technologien müssen zur Herstellung von Polypeptid-Bibliotheken die DNA Moleküle, welche für die Polypeptidevarianten kodieren, in
20 die Zellen gebracht werden. Die Herstellung grosser Mengen von zirkulärer DNA und deren Transformation in Zellen ist sehr aufwändig. Zudem ist die Grösse der Polypeptidbibliotheken beschränkt. Mit sehr grossem Aufwand konnten Bibliotheken mit 10^{11} Polypeptidvarianten hergestellt werden. Routinemässig können Bibliotheken mit 10^8 bis 10^9 Polypeptidvarianten kloniert werden.

25

Bei einem weiteren Verfahren zur Evolution von Polypeptiden werden die Polypeptide (Phänotyp) durch die Fusion mit einem DNA bindenden Protein, dem Lac Repressor, an die kodierenden Nukleinsäuren (Genotyp) gekoppelt (Cull M.G. et al. (1992) Screening for receptor ligands using large libraries of peptides linked
30 to the C terminus of the lac repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89(5) : 1865-9). Das Repressor-Protein verbindet die Polypeptide mit den codierenden Plasmiden durch nicht-kovalentes Binden an eine Lac Operator-Sequenz auf dem Plasmid. Um zu gewährleisten, dass die Polypeptide an die für sie codierenden Nuk-

leinsäuren binden, findet die Reaktion im Innern von bakterieller Zelle statt. Durch die *in vivo* Kopplung von Geno- und Phänotyp ist auch bei dieser Technologie die Grösse der Polypeptid Bibliothek limitiert, da die Herstellung grosser Mengen von zirkulärer DNA und die Transformation derer in die Zellen sehr aufwändig ist. Die nicht-kovalente Bindung von Nukleinsäuren und Polypeptiden verlangt nach sehr milden Reaktionsbedingungen während der Selektion. Im Weiteren können wegen der nicht-kovalenten Bindung Polypeptide mit sehr guten Bindungseigenschaften (langlebige Komplexe mit langsamer Dissoziationskinetik (niedriger k_{off})) nicht selektiert werden.

10

Beim sogenannten „Ribosome Display“ (oder auch Polysome Display) Verfahren werden die Polypeptide (Phänotyp) auf der Oberfläche von Ribosomen mit den kodierenden Nukleinsäuren (Genotyp) verbunden (Roberts R.W. (1999) Totally *in vitro* protein selection using mRNA-protein fusions and ribosome display. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3(3) : 268-73). Die Kopplung kommt zustande, wenn der Prozess der Translation der Ribonukleinsäure angehalten wird. Das entstehende Polypeptid bleibt am Ribosom zusammen mit der kodierenden Messenger Ribonukleinsäure (mRNA) verbunden. Mit dem Verfahren wurden Polypeptide (zum Beispiel Peptide, Antikörper oder Ankyrine), welche spezifisch an verschiedene Ziel-

polypeptide binden, isoliert. Das Verfahren hat den Vorteil, dass es vollständig *in vitro* stattfindet, wodurch grössere Polypeptid Bibliotheken ($>10^{12}$) hergestellt werden können. Eine Schwäche der Ribosome Display Technologie besteht darin, dass Selektionen unter bestimmten Bedingungen (hohe Salzkonzentration, tiefe Temperatur) durchgeführt werden müssen, bei welchen die

RNA/Ribosom/Polypeptid-Komplexe stabil sind.

30

Bei einem weiteren bekannten *in vitro* Verfahren zur Kopplung von Phänotyp und Genotyp wird die Messenger Ribonukleinsäure (mRNA) kovalent an das Polypeptid gebunden. Bei dem „*in vitro* Virus“ genannten Verfahren wird mRNA, die am 3'-Ende eine Puromycin-Gruppe trägt, translatiert. Wenn das Ribosom das Ende des codierenden Bereichs (Open Reading Frame) der mRNA erreicht, wird die Puromycin-Gruppe kovalent an das entstehende Polypeptid gebunden. Das Verfahren hat gegenüber der Ribosome Display Technologie den Vorteil, dass der Phä-

- notyp kovalent an den Genotyp gekoppelt ist. Ein Schwachpunkt des Verfahrens ist, dass der Genotyp durch mRNA kodiert ist. Die mRNA kann durch sehr kleine RNase Verunreinigungen enzymatisch abgebaut werden. Es sind verschiedene, dem ‚*in vitro* Virus‘ verwandte Verfahren bekannt, bei welchen die RNA durch aufwändige Prozesse durch stabilere DNA ersetzt wird (Roberts R.W. and Szostak J.W. (1997) RNA-peptide fusions for the *in vitro* selection of peptides and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94(23) : 12297-302; U.S. Patent 6,281,344: Nucleic acid-protein fusion molecules and libraries).
- 5
- 10 Ein Verfahren zur *in vitro* Kopplung von Phäno- und Genotyp wurde vorgeschlagen, welches auf der Nicking-Eigenschaft des Replikations-Initiators des E.coli Bakteriophagen P2A basiert (FitzGerald, K. (1999) *In vitro* display technologies – new tools for drug discovery. *Drug Discovery Today*, Vol. 5, No. 6). Der Replikations-Initiator ist eine Endonuklease, welche einen Strang der Desoxyribonukleinsäure (DNA) bricht und dabei über eine Tyrosin Gruppe kovalent an das 5′-Ende der DNA gekoppelt wird. Da bei der bakteriellen Produktion von Proteinen die Translation schon während der Transkription erfolgt, kommt das neu entstandene P2A-Polypeptid-Fusionsprotein in Kontakt mit seiner codierenden DNA. Die cis-Aktivität des Enzyms soll die Kopplung von Geno- und Phänotyp *in vitro* erlauben.
- 15
- 20 Es sind jedoch keine Polypeptide bekannt, dessen Eigenschaften durch dieses Verfahren verbessert wurden.

- Ein weiteres bekanntes Verfahren zur *in vitro* Kopplung von Phäno- und Genotyp beruht auf der nicht-kovalenten, aber hoch-affinen Bindung von mRNA-Aptameren mit Tat-Proteinen des HIV1 (Fujita S. et al. (2002) Novel approach for linking genotype to phenotype *in vitro* by exploiting an extremely strong interaction between RNA and protein. *J Med. Chem.* 45(8) : 1598-606). Die Kopplung von Geno- und Phänotyp findet wie beim ‚Ribosome Display‘ und ‚*in vitro* Virus‘ Verfahren während der Translation *in vitro* statt. Das Verfahren hat den Nachteil, dass die Kopplung von Geno- und Phänotyp nicht kovalent ist und dadurch die Gefahr besteht dass die Komponenten dissoziieren. Im Weiteren beruht das Verfahren auf mRNA zur Kodierung des Genotyps. Es besteht somit die Gefahr, dass RNA durch RNAsen abgebaut wird.
- 25
- 30

- Ein gattungsgemässes Verfahren basiert auf der Kopplung von Streptavidin-Polypeptid-Konjugaten mit der sie kodierenden biotinylierten Nukleinsäure in Mikrokompartimenten (Doi N. and Yanagawa H. (1999) STABLE: protein-DNA fusion system for screening of combinatorial protein libraries in vitro. *FEBS Lett.* 457(2) : 227-30). Um die cis-Konjugation von Geno- und Phänotyp zu gewährleisten, werden bei diesem Verfahren die Streptavidin-Polypeptid-Konjugate in wässrigen Kompartimenten einer Wasser-in-Öl Emulsion transkribiert und translatiert. Jedes Kompartiment enthält höchstens eine Nukleinsäure. Nach der Translation der Streptavidin-Polypeptid-Konjugate können diese an die kodierende biotinylierte DNA im Kompartiment binden. Die Polypeptid-Nukleinsäure Konjugate können anschliessend aus der Emulsion extrahiert werden und einer Selektion unterworfen werden. Die Limitation dieses Verfahrens besteht in der uneffizienten Expression von Streptavidin in dem Transkriptions-/Translations-Mix.
- Weitere ähnliche Verfahren zur Kopplung von Geno- und Phänotyp; welche auch auf der Kompartimentalisierung von DNA zusammen mit einem Transkriptions-/Translations-Mix in einer Wasser-in-Öl Emulsion beruhen, sind bekannt (Sepp A. et al. (2002) Microbead display by in vitro compartmentalisation: selection for binding using flow cytometry. *FEBS Lett.* 532(3) : 455-8; US Patent 6,489,103: In vitro sorting method). In einem solchen Verfahren wurden Kügelchen als Träger von Geno- und Phänotyp verwendet. Auf jedem Kügelchen wurde ein kodierendes DNA Fragment und eine Vielzahl von Antikörpern spezifisch für eine Peptidsequenz befestigt. Das DNA Fragment trägt die genetische Information für eine Peptidsequenz, welche an ein variables Polypeptid fusioniert ist. Die Kügelchen werden in separate Kompartimente einer Wasser-in-Öl Emulsion zusammen mit einem Transkriptions-/Translations-Mix eingeschlossen. Die exprimierten Polypeptid-Peptid Fusionen werden durch die Bindung an die Antikörper auf dem Kügelchen immobilisiert. Das Verfahren hat den Nachteil, dass die Kopplung von Geno- und Phänotyp nicht kovalent ist, so dass die Komponenten dissoziieren können. Dadurch besteht die Gefahr, dass ein Austausch von Polypeptid-Peptid Fusionen zwischen verschiedenen Kügelchen stattfindet.

- Ein Verfahren zur kovalenten Kopplung von Geno- und Phänotyp *in vivo* ist bekannt, bei welchem Methylase-Polypeptid Fusionen an DNA gekoppelt werden (US Patent 5,856,090 DNA-methylase linking reaction). Die DNA enthält die Methylase Erkennungssequenz 5'-GGCC-3', wobei die dritte Base (Cytidin) durch Fluorodeoxycytidin (F) ersetzt wird. Die neue Sequenz 5'-GGFC-3' dient als Suicide Inhibitor (oder auch 'Mechanism based Inhibitor' genannt). Methylase-Polypeptid Fusionen, welche mit dieser Sequenz reagieren, bleiben irreversibel an die DNA gebunden. Zirkuläre DNA, welche die Sequenz 5'-GGCC-3' enthält und gleichzeitig das Gen für ein Methylase-Polypeptid trägt, wird in bakterielle Zellen gebracht. Zum Nährmedium der Zellen wird Fluorodeoxycytidin gegeben, welches während der Replikation des Plasmids in die 5'-GGCC-3' Sequenz eingebaut wird. Methylase-Polypeptid Fusionen können kovalent an das Plasmid binden. Das Verfahren hat den Nachteil, dass die Anzahl von Methylase-Fusionspeptiden, welche an ein Plasmid gekoppelt werden, nicht genau definiert werden kann. Durch die Immobilisation von mehreren Polypeptiden können bei der Selektion wegen Aviditätseffekten Polypeptide mit schwachen Bindungseigenschaften selektiert werden. Zudem ist durch die *in vivo* Kopplung von Geno- und Phänotyp auch bei dieser Technologie die Grösse der Polypeptid Bibliothek limitiert.
- Für die kovalente Kopplung eines Polypeptids mit DNA sind verschiedene Möglichkeiten denkbar. Es gilt zu beachten, dass die Kopplung an die DNA spezifisch ist, und eine definierte Anzahl von Polypeptidmolekülen pro DNA Molekül gebunden werden. Letzteres ist wichtig, weil bei Selektionsexperimenten die Anzahl von Polypeptiden, die an ein DNA Molekül gekoppelt sind, entscheidend für den Ausgang des Experiments sein kann. Werden zum Beispiel Binder selektiert, kann der Aviditätseffekt dazu führen, dass Polypeptide mit niedriger Affinität selektiert werden, weil mehrere Polypeptide an ein DNA Molekül gebunden sind. Dies ist manchmal wünschenswert, wenn es schwierig ist, überhaupt Binder gegen ein bestimmtes Molekül zu erhalten. In diesem Fall wird versucht, zuerst Binder mit niedriger Affinität zu selektionieren, um anschliessend ausgehend von diesen hochaffine Binder herzustellen. Selektionen von Antikörpern mit der Phage Display Technologie haben gezeigt, dass es sehr schwierig ist, Antikörper mit hoher Affinität zu selektionieren, wenn sich mehr als ein Antikörper auf der Phageno-

berfläche befinden (Winter G. et al. (1994) Making antibodies by phage display technology. *Ann. Rev. Immunol.* 12 : 433-55). Das zu lösende Problem ist, je nach Stand des Experiments die Anzahl der Polypeptide, die pro DNA Molekül gekoppelt werden, zu kontrollieren.

5

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, ein alternatives Verfahren vorzuschlagen, welches erlaubt, mit geringem zeitlichen Aufwand (z.B. in wenigen Tagen) Nukleinsäurebibliotheken herzustellen.

- 10 Diese Aufgabe wird durch die Merkmalskombination des unabhängigen Anspruchs 1 gelöst, indem eine Methode zur Evolution von Polypeptiden vorgeschlagen wird, die vollständig *in vitro* stattfindet. Weitere Erfindungsmerkmale bzw. bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.
- 15 Erfindungsgemäss werden die Nukleinsäuren *in vitro* (Genotypen) in effizienter und definierter Weise mit den von ihnen kodierten Polypeptiden (Phänotypen) gekoppelt. Eine kovalente Bindung zwischen Nukleinsäure und Polypeptiden gewährleistet dabei, dass während der Selektion der Polypeptide verschiedenste Bedingungen angewendet werden können, ohne dass die Nukleinsäure oder die
- 20 Verbindung zwischen Nukleinsäure und Polypeptid Schaden nehmen. Es soll eine definierte Anzahl von Polypeptiden pro Nukleinsäure gebunden sein. Für die Selektion von hochaffinen Bindern wird vorzugsweise genau ein Polypeptid pro Nukleinsäuremolekül gebunden (Vermeiden von Aviditätseffekten). Um die Grösse der Nukleinsäurebibliotheken zu erhöhen und den Zeitaufwand für die Herstellung
- 25 der Nukleinsäure-Polypeptid Komplexe zu vermindern, umfasst das Verfahren vorzugsweise keine Transformation von Zellen.

Die vorliegende Erfindung wird an Hand von beispielhaften Figuren näher erläutert. Dabei zeigen:

30 Fig. 1 Schema des Selektionszyklus gemäss vorliegender Erfindung;

Fig. 2 Schematische Darstellung der Prozesse innerhalb eines Mikrokompartiments einer Wasser-in-Öl Emulsion;

Fig. 3a Stabilität der Grössenverteilung der Wasserkompartimente der Wasser-in-Öl Emulsion;

Fig. 3b Der bevorzugte Durchmesser der Wasserkompartimente liegt zwischen 1 μm und 2 μm ;

Fig. 4 Kovalente Kopplung von DNA mit M.Hae III Methylase;

Fig. 5 Selektion von M.Hae III-His-tag-DNA Komplexen mittels Ni-Affinitätschromatographie.

Im Folgenden wird eine Übersicht über die Verfahrensschritte vorliegender Erfindung gegeben (vgl. Figur 1). In einem ersten Schritt **A** wird eine Sammlung **1** von zueinander leicht unterschiedlichen Genen (DNA-Bibliothek **1**) zusammen mit einer Suspension, welche die Expression dieser Gene ermöglicht (Transkriptions-/Translationslösung), in der Wasserphase einer Wasser-in-Öl Emulsion **3A** eingeschlossen. Dies geschieht bevorzugt in einer Weise, dass pro Wasserkompartiment **3B** maximal eine Nukleinsäure (vorzugsweise ein lineares DNA Molekül **2**) vorhanden ist. Dank der Präsenz der Transkriptions-/Translationslösung wird nun ausgehend von dem in einem Wasserkompartiment vorhandenen Gen das entsprechende Polypeptid exprimiert.

Erfindungsgemässe Fusionspolypeptide **5** bestehen aus den zwei Teilpeptiden I und II. Das Teilpeptid I **5A** ist ein Polypeptid, das mit einer am DNA Molekül sich befindenden chemischen Gruppe oder der Nukleinsäure selbst reagieren kann. Diese chemische Gruppe (Stern *, hier am linken Ende der DNA **2**) kann entweder in der Sequenz der DNA **2** angeordnet sein oder an einem der Enden der DNA **2** angefügt werden. Durch eine chemische Reaktion wird zwischen dem Polypeptid und dem DNA Molekül eine kovalente Bindung und damit eine DNA-Polypeptid-Fusion bzw. ein Polypeptid-DNA Komplex **6** gebildet. Das variable Teilpeptid II **5B** ist ein Polypeptid, dessen Eigenschaften durch die *in vitro* Evolution modifiziert werden sollen.

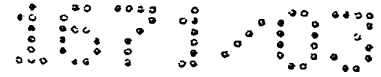
Die DNA-Polypeptid-Fusionen **6** werden nach erfolgter Kopplung aus der Emulsion extrahiert (Schritt **B**). Man erhält so eine Sammlung **4** von DNA-Polypeptid-Fusionen bzw. Polypeptid-DNA Komplexen **6**, in welcher die DNA Moleküle **2** kovalent an die Polypeptide **5A/5B** gebunden sind, wobei jedes Nukleinsäuremolekül **2** an dasjenige Fusionspolypeptid **5** gebunden wird, für welches es kodiert.

Mit dieser Sammlung **4** von DNA-Polypeptid-Fusionen **6** werden im Experiment Polypeptide mit gewünschten bzw. bestimmten Eigenschaften selektiert (Schritt **C**). Bei der Selektion von bindenden Polypeptiden kann dies zum Beispiel mittels Affinitätsreinigung geschehen. Dabei wird die Sammlung **4** von Polypeptid-DNA Komplexen **6** zu einem immobilisierten Zielmolekül **8** gegeben, gegen welches ein bindendes Polypeptid **7** gefunden werden soll. Die nicht bindenden Polypeptid-DNA Komplexe werden gewaschen.

Anschliessend (Schritt **D**) wird die genetische Information der gebundenen Polypeptide **7** durch PCR (Polymerase Chain Reaction) amplifiziert. Durch die Amplifikation erhält man eine neue Sammlung **9** von Genen, mit welcher ein weiterer Selektionszyklus durchgeführt werden kann (Weg **E**). Nach einer genügenden Anzahl von solchen Selektionsrunden können die selektierten DNA Fragmente entweder für weitere Zyklen neu mutiert oder zur näheren Charakterisierung der kodierten Polypeptide kloniert werden (Weg **F**).

Mit diesem Schema wird der Prozess der Evolution – Generation von Diversität, Überleben der Fittesten, Vermehrung und Generation von neuer Diversität – im Reagenzglas imitiert. Vorteile gegenüber existierenden Technologien umfassen:

- a) Der gesamte Prozess findet *in vitro* statt, d.h. die Transformation von lebenden Zellen, welche limitierend für die Grösse der Library ist, kann umgangen werden.
- b) Der Polypeptid-Genotyp Komplex enthält keine RNA. Somit spielt die Gefahr einer Kontamination mit RNase (im Gegensatz zu anderen *in vitro* Methoden wie Ribosome Display oder mRNA Display) keine Rolle.



- 5 c) Das erfindungsgemässe Verfahren ermöglicht eine einfache Herstellung der DNA Bibliotheken. Weil nur PCRs durchgeführt werden müssen, ist weder ein Restriktionsverdau, noch eine Ligation oder eine Transformation von Zellen notwendig. Dadurch ergibt sich eine starke Verkürzung des Zeitbedarfs für die Herstellung einer Nukleinsäurebibliothek (wenige Tage statt mehrere Wochen), womit die gestellte Aufgabe erfüllt wird. Mehrere Evolutionszyklen können daher nacheinander und mit geringem Aufwand in relativ kurzer Zeit durchgeführt werden, was grosse Vorteile mit sich bringt.
- 10 d) Es wird eine kovalente Bindung zwischen Polypeptid (Phänotyp) und DNA (Genotyp) erzeugt. Die kovalente Bindung hat den Vorteil, dass nach Extraktion der Polypeptid/DNA-Fusionen aus der Emulsion, die Stabilität der Komplexe gewährleistet ist.
- 15 e) Vorzugsweise wird pro Nukleinsäuremolekül nur ein einziges Fusionspolypeptid gebunden. Bei einem minimalen Aviditätseffekt und einer erhöhten Sensitivität wird dadurch die Selektion von hochaffinen Bindern (monovalentes Display) ermöglicht.
- 20 Im Speziellen beinhaltet die Erfindung die vorzugsweise Verwendung der Hae III Methylase aus *Haemophilus aegypticus* (ATCC 1116) als konstantes Teilpeptid I des Fusionspolypeptids. Diese Methylase bildet mit 5'-GGFC-3' enthaltenden DNA Molekülen einen kovalenten Komplex, wobei F für 5-Fluorodeoxycytidin steht. Die zu modifizierenden, variablen Teilpeptide II können an den C-Terminus der Me-
- 25 thylase fusioniert werden.

Im Folgenden werden die einzelnen Verfahrensschritte gemäss Anspruch 1 der vorliegenden Erfindung näher erläutert:

- 30 Die Wasser-in-Öl Emulsion wird zur Kompartimentalisierung benutzt. Es werden viele kleine, von Öl umgebene Wasserkompartimente gebildet, die dazu dienen, ein Gen (hier DNA Molekül) und dessen genetische Produkte räumlich zusammenzuhalten. Das Prinzip der Kompartimentalisierung ermöglicht es, dass ein

Gen von den positiven Eigenschaften des von ihm kodierten genetischen Produkts (RNA oder Polypeptid) profitieren kann. In der Natur entsprechen die Zellen den hier vorgestellten Wasserkompartimenten der Emulsion. Die genetischen Produkte einer Zelle, welche die Vermehrungsmöglichkeiten einer Zelle verbessern, fördern die Verbreitung des eigenen Genoms. Auf diese Weise kann Evolution stattfinden. Gene werden dank positiven Eigenschaften der von ihnen kodierten Produkte selektiert und vermehrt. Mit Hilfe von Wasser-in-Öl Emulsionen wird das Konzept der Kompartimentalisierung *in vitro* imitiert. Die Kompartimente werden in der vorliegenden Erfindung dazu benötigt, Geno- und Phänotyp solange zusammenzuhalten, bis sie miteinander eine kovalente Bindung eingegangen sind.

Bei der Herstellung der Wasser-in-Öl Emulsion ist darauf zu achten, dass die Wasserkompartimente die richtigen physikalischen Eigenschaften haben, da sonst die hier vorliegende Erfindung nicht funktionieren kann. Die Wasser-in-Öl Emulsion muss so stabil sein, dass die Gene (die DNA Moleküle) und deren genetische Produkte (mRNA und Polypeptide) nicht zwischen verschiedenen Kompartimenten diffundieren können. Die Wasserkompartimente dürfen also nicht miteinander fusionieren. Die Wasser-in-Öl Emulsion wird durch die Zugabe von Tensiden (z.B. Span 80, Tween 80) zur Ölphase (z.B. Mineralöl) stabilisiert. So kann eine spontane Trennung der Wasser- und Ölphase verhindert werden.

Der Zweck der Kompartimentalisierung besteht darin, die Gene und deren Produkte zusammenzuhalten. Sie bewirkt, dass das Polypeptid, welches auf Grund der im selben Kompartiment vorliegenden genetischen Information synthetisiert wurde, nicht zu einem anderen DNA Molekül diffundieren und mit diesem eine kovalente Bindung eingehen kann. Ein Polypeptid darf nur mit dem DNA Molekül einen kovalenten Komplex bilden, welches für die Synthese dieses Polypeptids verantwortlich ist.

30

In Figur 2 sind die Geschehnisse bzw. Prozesse innerhalb eines Mikrokompartmentes bzw. Wasserkompartmentes einer Wasser-in-Öl Emulsion schematisch dargestellt. Pro Wasserkompartment befindet sich idealerweise bzw. vorzugsweise



maximal ein DNA Molekül **2** mit einem Suicide Inhibitor bzw. einer chemischen Gruppe (Sternsymbol). In einem ersten Schritt (**III**, Transkription) wird ausgehend von dem sich in dem Wasserkompartiment befindlichen DNA Molekül **2** mRNA **10** synthetisiert, welche als Template für einen zweiten Schritt (**IV**, Translation) benutzt wird. Auf diese Weise wird das Fusionsprotein bzw. Fusionspolypeptid **5** (bestehend aus den Domänen **5A** und **5B**) exprimiert. Dieses Fusionspolypeptid **5** reagiert mit dem Suicide Inhibitor (*) an oder auf dem DNA Molekül (Schritt **V**) und bildet so einen DNA-Polypeptid-Komplex **6** (vgl. Fig. 1). Diese Kopplung von Geno- und Phänotyp ermöglicht die Selektion der Gene über die Eigenschaften des Phänotyps. Die anschliessende Amplifikation (hier Polymerase Chain Reaction, PCR) der selektierten Gene bewirkt eine Vermehrung der im Selektionsprozess fittesten DNA Moleküle. Wenn nun ein Polypeptid eine kovalente Bindung mit einem DNA Molekül eingeht, welches nicht für dieses Polypeptid codiert, dann könnten DNA Moleküle selektiert werden, die nicht für Polypeptide mit gewünschten bzw. bestimmten Eigenschaften codieren. Deshalb ist es bei der *in vitro* Evolution bedeutend, dass Polypeptide mit ihren entsprechenden Genen gekoppelt werden.

Die Grösse der Wasserkompartimente **3B** ist sehr wichtig, um einerseits die Expression der Gene (Patent US 6,489,103 B1, In vitro sorting Method) und andererseits die Kopplung von DNA Molekülen **2** mit dem exprimierten Fusionspolypeptid **5** in effizienter Weise zu gewährleisten. Die Kopplungseffizienz ist von der Grösse des Wasserkompartiments abhängig, weil die Kopplungsreaktion ein bimolekularer Prozess ist. Das heisst, die Geschwindigkeit der Kopplung nimmt mit steigender Konzentration der DNA und des zu koppelnden Proteins zu.

Die Konzentration der DNA gibt an, wie viele Moleküle eines Stoffes pro Volumeneinheit zu finden sind. In der vorliegenden Erfindung ist es ein bevorzugtes Ziel, maximal ein DNA Molekül pro Wasserkompartiment vorliegen zu haben, weil dadurch die korrekte Geno-Phänotyp-Fusionen erhalten wird. Aus diesem Grund sinkt die Konzentration der DNA mit der dritten Potenz mit der Zunahme des Durchmessers des Wasserkompartiments. So ergibt ein DNA Molekül in einem Wasserkompartiment mit 2 µm Durchmesser eine Konzentration von 0.4 nM,

während für ein DNA Molekül in einem Mikrokompartiment mit 1 µm Durchmesser eine Konzentration von 3.2 nM berechnet wird. Dieselben Überlegungen können für die exprimierten Polypeptide gemacht werden. Die für diese Erfindung angepeilte Grösse (d.h. der bevorzugte Durchmesser) der Wasserkompartimente liegt zwischen 1 µm und 2 µm.

Mit einem durchschnittlichen Kompartimentdurchmesser von 1 µm können in 1 ml Emulsion etwa 10^{11} Kompartimente gebildet werden. Es ist wünschenswert, eine möglichst hohe Zahl von Kompartimenten herzustellen, weil dann mit grösseren DNA Bibliotheken gearbeitet werden kann. Eine gewisse Minimalgrösse der Wasserkompartimente darf jedoch nicht unterschritten werden, weil sonst gemäss US 6,489,103 nicht alle Moleküle darin Platz finden, die für die Expression der Polypeptide benötigt werden.

Toleranz des erfindungsgemässen Verfahrens in Bezug auf falsch positive Selektionen im ersten Selektionszyklus ist gegeben. Gelangt zum Beispiel mehr als ein DNA Fragment in ein Kompartiment, so ist es möglich dass ein erwünschter Phänotyp fälschlicherweise mit einem nicht erwünschten Genotyp gekoppelt wird. Wird der Komplex in der folgenden Selektion isoliert, so wird dessen DNA durch die PCR Amplifikation propagiert. Solche falsch positiv selektierten Genotypen stellen kein Problem dar, weil sie in einer der folgenden Selektionen eliminiert werden können.

Die Wasser-in-Öl Emulsion wird durch einfaches Mischen der wässrigen und der organischen Phase hergestellt. Das Mischen kann mit verschiedenen in der Literatur beschriebenen Methoden erreicht werden (Finch C.A. et al. (1993) Encapsulation and controlled Release. *Spec. Publ.-R. Soc. Chem.* 138, 35). In der vorliegenden Erfindung wird die Ölphase mit einem Magnetrührer gerührt, während die wässrige Phase langsam zugetropft wird. Nach Zugabe der wässrigen Phase wird für eine bestimmte Zeit weiter gerührt, bis die Kompartimente der Emulsion die gewünschte Grössenverteilung aufweisen. Die Rühdauer und Rührgeschwindigkeit sind sehr wichtige Parameter für die Grössenverteilung der Wasserkompar-

timente (Tawfik D.S. and Griffiths A.D. (1998) Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat. Biotechnol.* 16(7), 652).

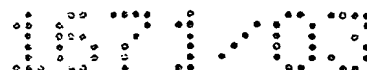
5 Damit in einer Wasser-in-Öl Emulsion Polypeptide ausgehend von linearen oder zirkulären DNA Fragmenten exprimiert werden können, muss zusammen mit der DNA die Maschinerie für die Proteinsynthese in die Kompartimente gebracht werden. Diese Maschinerie besteht aus einem gekoppeltem *in vitro* Transkriptions-/Translationssystem. Es sind verschiedene kommerzielle Produkte erhältlich. Die zellfreie Expression von Polypeptiden in einer Wasser-in-Öl Emulsion wurde bereits 10 1992 in der Literatur beschrieben (Nemetkin S.N. et al. (1992) Cell-free translation in reversed micelles. *FEBS* 309, 330). Die Ausbeute eines in einer Wasser-in-Öl Emulsion exprimierten Polypeptids ist gewöhnlich geringer, als wenn es in nicht kompartmentalisierter Lösung exprimiert würde. Das Mass der Abnahme der Ausbeute hängt von dem exprimierten Polypeptid ab (Patent US 15 2002/119459, Optical sorting method).

Die kovalente Kopplung von Polypeptid und DNA ist notwendig, damit nach der Expression der Polypeptide in der Wasser-in-Öl Emulsion die DNA und das Polypeptid auch nach Extraktion der wässrigen Phase aus der Emulsion irreversibel 20 miteinander verbunden bleiben.

Die Polypeptid-DNA Komplexe werden nach Expression der Polypeptide und deren Kopplung mit DNA in der wässrigen Phase aus der Emulsion extrahiert. Dazu wird die Emulsion zentrifugiert, wobei die Wasserkompartimente auf den Grund 25 des Reaktionsgefäßes sinken. Die Wasserkompartimente bilden ein Sediment, sind aber immer noch intakt. Der ölige Überstand wird entfernt. Nun kann die wässrige Phase aus der Ölphase extrahiert werden (vgl. Tawfik D.S., and Griffiths A.D., 1998).

30

Mit der extrahierten Sammlung von Polypeptid-DNA Fusionen wird das eigentliche Selektionsexperiment durchgeführt.



Das Molekül, gegen welches ein Binder gemacht werden soll, wird auf einer festen Oberfläche immobilisiert. Die Oberfläche kann das Harz einer Chromatographiesäule, eine Plastikoberfläche oder kleine Kügelchen sein (es gibt viele verschiedene, kommerziell erhältliche Kügelchen). Die Polypeptid-DNA Fusionen, welche an das immobilisierte Molekül binden können, bleiben auch auf der festen Oberfläche, wenn das System gewaschen wird. Nach dem Waschen werden die verbliebenen Polypeptid-DNA Fusionen von der Oberfläche eluiert und anschließend mittels PCR amplifiziert. Bei der Verwendung von Kügelchen, können die verbliebenen DNA Moleküle eventuell direkt nach dem Waschen (ohne Elution) amplifiziert werden. Nach der Amplifikation erhält man wiederum eine DNA Library. Mit dieser kann entweder direkt ein weiterer Selektionszyklus durchgeführt werden, oder es können neue Mutationen eingeführt werden, um die Diversität der DNA Library zu erhöhen. Mutagenesemethoden sind in der Literatur beschrieben und sind dem Fachmann bekannt.

Ein bevorzugter Weg zur Ausführung der Erfindung wird im Folgenden beschrieben:

Für die Kopplung zwischen Polypeptid und Nukleinsäure wird das Protein Hae III Methylase aus *Haemophilus aegypticus* (M.Hae III) (ATCC 1116) verwendet. M.Hae III methyliert in der Erkennungssequenz 5'-GGCC-3' die dritte Base von links (Cytidin, C). Ein DNA Fragment, in welchem dieses Cytidin durch 5-Fluorodeoxycytidin (F) ersetzt wird (5'-GGFC-3'), dient als Suicide Inhibitor (oder auch Mechanism based Inhibitor genannt) für die Hae III Methylase und ist der Ort der kovalenten Bindung zwischen DNA und Polypeptid. Dieser Suicide Inhibitor ist seit längerem bekannt; er wurde für die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der M.Hae III Methylase im Komplex mit ihrem Substrat entwickelt (Chen L. et al. (1991) Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *Biochemistry* 30, 11018). Durch die Verwendung von Oligonucleotiden, welche die modifizierte Base 5-Fluorodeoxycytidin enthalten, können die Kopplungsstellen mittels PCR in die DNA, welche später für die Selektionsexperimente benutzt wird, auf einfache Weise eingebaut werden. Mit 5-

Fluorodeoxycytidin modifizierte Oligonucleotide sind kommerziell erhältlich (Microsynth, Balgach, Schweiz).

- Das Polypeptid, welches durch *in vitro* Evolution in seinen Eigenschaften verändert werden soll, wird an den C-Terminus der Methylase fusioniert. Das Fusionsprotein besteht also aus zwei Domänen, von denen die eine (Hae III Methylase) für die kovalente Kopplung an die DNA verantwortlich ist, während die andere Domäne die zu evolvierende ist.
- 10 Eine DNA-Bibliothek bestehend aus linearen DNA Fragmenten, welche für M.Hae III Fusionsproteine codieren, wird zusammen mit Transkriptions-/Translationslösung und dem Kofaktoren S-Adenosylmethionin (SAM) in eine Wasser-in-Öl Emulsion eingebracht. Die DNA wird in den Wasserkompartimenten transkribiert und die entstandene mRNA translatiert. Auf diese Weise entstehen M.Hae III Fu-
- 15 sionsproteine, welche mit dem 5-Fluorodeoxycytidin reagieren und so eine kovalente Bindung mit der DNA eingehen. Nach Extraktion der DNA-Methylase-Fusionsprotein Komplexe aus der Wasser-in-Öl Emulsion kann ein Selektionsexperiment durchgeführt werden, um entweder ein bindendes oder allosterisches Polypeptid mit gewünschten Eigenschaften zu erhalten.

20

Beispiel 1

In diesem Beispiel wird gezeigt, wie eine Wasser-in-Öl Emulsion mit den gewünschten physikalischen Eigenschaften produziert wird.

25

- 50 µl der wässrigen Phase (eisgekühlter Transkriptions/Translations-Mix (Roche) mit ca. 100 ng DNA (Template für die Expression, Menge kann variiert werden) und 80 µM S-Adenosylmethionin) wurden zu 950 µl eisgekühlter Ölphase (Mineralöl (Sigma, M-5904), 4.5% (v/v) Span 80 (Fluka) und 0.5% (v/v) Tween 80 (Fluka), frisch zubereitet) gegeben.
- 30

Die Zugabe erfolgte tropfenweise in ein Pillengläschen (Forma Vitrum AG, 40.0 x 18.75 mm) während 2 min. Während dem Zutropfen der wässrigen Phase in 5

Schritten à 10 µl wurde mit einem Magnetrührer (Heidolph MR 1000) bei 2200 rpm (rounds per minute) gerührt. Nach Zugabe der wässrigen Phase wurde während 5 min. weiter mit 2200 rpm gerührt, um die gewünschte Grössenverteilung der Kompartimente zu erreichen.

5

In Figur 3a und 3b sind Grössenverteilungen von Wasserkompartimenten einer Wasser-in-Öl Emulsion gezeigt, welche wie oben beschrieben hergestellt wurden. Auf der X-Achse sind die Durchmesser der Mikrokompartimente (PD, in µm) in logarithmischer Skala aufgetragen. Die Werte der Y-Achse (% WP) geben den Anteil der wässrigen Phase in einem Mikrokompartiment der entsprechenden Grösse an (WP, in % des Gesamtvolumens der wässrigen Phase).

10

Figur 3a zeigt die Grössenverteilungen einer Wasser-in-Öl Emulsion zu verschiedenen Zeitpunkten. Eine Emulsion wurde hergestellt und die Grössenverteilung der Wasserkompartimente unmittelbar anschliessend mittels Lichtstreuung bestimmt (Zeit $t_1 = 0$ h, ausgezogene Kurve 1). Dieselbe Messung wurde noch einmal gemacht, nachdem die Wasser-in-Öl Emulsion während 96 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt worden war (Zeit $t_2 = 96$ h, gestrichelte Kurve 2). Die durch diese beiden Kurven 1 und 2 dargestellten Grössenverteilungen unterscheiden sich nicht signifikant; die Emulsionen sind stabil. Die Grössenverteilungen wurden mit dem Mastersizer X (Malvern Instruments Ltd., UK) gemessen.

15

20

Figur 3b zeigt die Reproduzierbarkeit von drei Wasser-in-Öl Emulsionen, die wie oben beschrieben hergestellt wurden. Die Profile der Grössenverteilungen (1, ausgezogene Line; 2, gepunktete Line und 3, gestrichelte Line) unterscheiden sich nicht signifikant; die Emulsionen sind reproduzierbar. Die Grössenverteilungen wurden mit dem Mastersizer X (Malvern Instruments Ltd., UK) gemessen.

25

Nach Expression der Polypeptide und der Bildung der DNA-Polypeptid-Fusionen wurde die wässrige Phase aus der Emulsion extrahiert. Die Emulsionen wurden während 6 min. bei 10'000 rpm zentrifugiert, der Öl-Überstand abgesogen und 150 µl PBS zur sedimentierten Emulsion gegeben.

30

Dann wurde 1 ml eiskalter, wassergesättigter Diethylether zugegeben, und die Probe mit dem Vortex gut gemischt. Das Reaktionsgefäß wurde stehen gelassen, damit sich organische und wässrige Phase trennen konnten. Die wässrige Phase wurde dann mit einer Pipette unter der organischen Phase entfernt, in ein separates Reaktionsgefäß gefüllt und für 10 min. bei 40 °C inkubiert, um Reste des Diethylethers verdunsten zu lassen.

Beispiel 2

10 In diesem Beispiel wird gezeigt, dass DNA kovalent mit einem Polypeptid gekoppelt werden kann.

Ein 268 bp langes DNA Fragment mit der Erkennungssequenz 5'-GGFC-3' wurde für die hier gezeigten Kopplungsexperimente benutzt (F = 5-Fluorodeoxycytidin).
15 2 nM DNA wurden in Reaktionspuffer (New England Biolabs, 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH = 8.5), 10 mM Dithiothreitol zusammen mit M.Hae III (38 nM) und 80 µM S-Adenosylmethionin (SAM) (New England Biolabs) unterschiedlich lange Zeit bei 37 °C inkubiert (15, 30, 60, 120, 180 und 240 min.). Die Reaktionen wurden durch Erhitzen auf 70 °C für 15 min. gestoppt (Inaktivierung der M.Hae
20 III). Die Proben wurden auf einem denaturierenden 10% TBE Urea Gel (Novex) analysiert. Das Gel wurde mit SYBR green II (Molecular Probes, Oregon, USA) gefärbt. Auf diese Weise können einzelsträngige Nucleinsäuren sichtbar gemacht werden (vgl. Figur 4).

25 In der ersten Spur M des in Figur 4 abgebildeten Gels ist ein Grössenmarker aufgetragen (10 bp ladder, Invitrogen). In den Spuren 2 – 7 sind von links nach rechts die Proben mit zunehmender Inkubationszeit aufgetragen (über der Spur ist jeweils die Inkubationszeit von 15'-240' in Minuten angegeben). Die Spuren X, Y und Z zeigen drei Negativkontrollen:

30

X: Probe ohne Kofaktoren SAM;

Y: Probe ohne M.Hae III Methylase;

Z: Probe ohne das für die Reaktionen benutzte DNA Fragment (268 bp).

Der Gebrauch eines denaturierenden Gels und die vorgängige Erhitzung auf 70°C stellen sicher, dass nur noch kovalent gebundene M.Hae III mit DNA assoziiert sind. An M.Hae III gebundene DNA wandert auf dem Gel langsamer als ungekoppelte DNA. Es ist in Fig. 4 deutlich zu sehen, wie mit zunehmender Inkubationszeit die obere Bande an Intensität zunimmt. Das heisst, es werden mit zunehmender Inkubationszeit immer mehr DNA Moleküle an M.Hae III gekoppelt. Nach ca. 2 h sind die Intensitäten der oberen und unteren Bande etwa gleich stark.

In einem doppelsträngigen DNA Molekül enthält nur ein Strang den Suicide Inhibitor. Wenn an jeder Erkennungssequenz 5'-GGFC-3' - und daher an jedem Doppelstrang DNA - ein M.Hae III kovalent gebunden ist, dann ist die Hälfte aller DNA Einzelstränge mit der Methylase gekoppelt. Da die obere und die untere Bande auf dem Gel die selbe Intensität zeigen, gibt es gleich viele unmodifizierte wie mit M.Hae III assoziierte DNA Einzelstränge. Dies bedeutet, dass die Koppelung nach ca. 2 h quantitativ erfolgte.

Beispiel 3

In diesem Beispiel wird gezeigt, wie M.Hae III Fusionsproteine *in vitro* exprimiert werden können.

Für die Expression der M.Hae III Fusionsprotein wurde ein kommerziell erhältliches Transkriptions-/Translationssystem benutzt (RTS E.coli HY Kit, Roche Applied Science, Schweiz). Damit ein Gen mit diesem *in vitro* System exprimiert werden kann, müssen am 5'- und am 3'-Ende regulatorische DNA Sequenzen angehängt werden. Dies geschieht mittels überlappender PCR (PCR assembly). Die Sequenzen sind kommerziell erhältlich (RTS E.coli Linear Template Generation Set, His-tag, Roche Applied Science, Schweiz).

Um den Suicide Inhibitor 5'-GGFC-3' mittels PCR in die DNA einzuführen, wurde mit den durch das Linear Template Generation Set erhaltenen DNA Fragmenten eine weitere PCR durchgeführt. Als Primer (Oligonucleotide) wurden Lin ext ba und Hae sub fo verwendet. Hae sub fo besitzt eine Erkennungssequenz für die

Hae III Methylase mit einem 5-Fluorodeoxycytidin (Suicide Inhibitor). Die PCR wurde mit folgenden Temperaturprogramm ausgeführt:

94 °C (3 min.) → [94 °C (1 min.) → 58 °C (1 min.) → 72 °C (3 min.)]₃₀ Zyklen
→ 72 °C (5 min.) → 4 °C.

5

Die Produkte der PCR wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen gereinigt.

Sequenz von Lin ext ba:

10 5'- GAT GCC GGC CAC GAT GCG TCC GGC -3'

Sequenz von Hae sub fo:

5'- C GTC ATG **GFC** TAT GCG GGC GAC CAC ACC CGT CCT GTG GAT -3'

15 DNA Template, welche für M.Hae III-His tag, M.Hae III-Flag tag, M.Hae III-Calmodulin-His tag und M.Hae III-ED-B-His tag codieren, wurden auf die selbe Weise hergestellt (ED-B: Extra Domain B von Fibronectin). Die Fusionen zu Hae III Methylase wurden alle an dessen C-Terminus angehängt. Die Fusionsproteine wurden in freier Lösung und in Emulsion exprimiert.

20

Expression in freier Lösung:

200 ng jedes DNA Templates wurden in 25 µl *in vitro* Transkriptions-/Translationsmix (Roche Applied Science) für 3 h bei 30 °C inkubiert.

25 *Expression in Emulsion:*

300 ng jedes DNA Templates wurden in 50 µl eisgekühlten *in vitro* Transkriptions-/Translationsmix (Roche Applied Science) gegeben. Die Wasser-in-Öl Emulsionen wurden wie oben beschrieben zubereitet. Die fertigen Emulsionen wurden für 3 h bei 30°C inkubiert. Anschliessend wurde die wässrige Phase aus der

30 Emulsion extrahiert (siehe oben).

Die Expressionslevel wurde mittels Western Blot analysiert (Detektion: anti-His-HRP Konjugat (Sigma) oder: anti-Flag (Sigma) mit anti-Maus-HRP Konjugat

(Sigma)). Dabei zeigte es sich, dass in Emulsion etwa 20 % der in freier Lösung erwarteten Expressionsausbeute erzielt wurden. Einzig das M.Hae III-Calmodulin-His tag Fusionsprotein konnte in der Expression in Emulsion nicht detektiert werden. Es wurden keine Fragmente der Fusionsproteine detektiert, was auf eine niedrige Proteasenaktivität schliessen lässt.

Die Methylaseaktivität der exprimierten Fusionsproteine wurde ebenfalls analysiert. Durch Methylierung der Zielsequenz 5'-GCGGCCGC-3' kann ein DNA Fragment vor dem Verdau mit dem Restriktionsenzym Not I geschützt werden. Wenn ein eine Not I Schnittstelle enthaltendes DNA Fragment mit M.Hae III Fusionsproteinen inkubiert wird, kann es danach nicht mehr von Not I geschnitten werden.

Transkriptions-/Translationslösungen, in welchen je ein M.Hae III Fusionsprotein exprimiert worden war, wurden mit einem eine Not I enthaltenden DNA Fragment inkubiert. Danach wurde getestet, ob die DNA Fragmente noch mit Not I geschnitten werden können. In allen getesteten Fällen waren die exprimierten Proteine aktiv. Ausnahme bildete wiederum das in Wasser-in-Öl exprimierte M.Hae III-Calmodulin-His tag Fusionsprotein, welches die DNA mit der Not I Schnittstelle nur etwa zur Hälfte schützte. Dies lässt auf ein tiefes Expressionslevel schliessen.

Beispiel 4

Anhand dieses Beispiels wird gezeigt, wie ein DNA Fragment, welches an M.Hae III-His tag gekoppelt ist, mittels Nickel-Affinitätschromatographie selektiert werden kann. Wenn das selbe DNA Fragment hingegen nicht an ein M.Hae III-His tag Protein gekoppelt ist, wird es nicht selektiert.

Zuerst wurde DNA mit dem M.Hae III-His tag Protein gekoppelt, indem ein für M.Hae III codierendes DNA Template mit rekombinant hergestelltem M.Hae III-His tag inkubiert wurde.

2 nM DNA wurden in Reaktionsbuffer (New England Biolabs, 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH = 8.5), 10 mM Dithiothreitol) zusammen mit 350 ng M.Hae III-His tag und 80 μ M S-Adenosylmethionin während eineinhalb Stunden bei 37 °C inkubiert (totales Reaktionsvolumen: 30 μ l). Bei der Negativkontrolle wurde M.Hae III-His tag weggelassen.

Nach der Inkubation wurden 50 μ l Puffer A (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 0.1% Tween 20 (Fluka) pH = 8.0) zugegeben.

20 μ l Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen, Cat. No. 36111) wurden zugegeben und die Probe wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Die magnetischen Ni-NTA Agarose Beads wurden mit Hilfe eines Magnetic Separators (MPC-S, Dynal, Norway) viermal mit 100 μ l Puffer B (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 0.1% Tween 20, pH = 8.0) gewaschen.

Nach dem letzten Waschgang wurden die Ni-NTA Magnetic Agarose Beads in 100 μ l sterilem Wasser resuspendiert.

Mit 1 μ l der gewaschenen Nickel-Beads wurde die Menge der verbliebenen DNA mittels quantitativer PCR analysiert (Wang A.M. et al. (1989) Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 9717). In dieser PCR wurden nur die letzten 331 Basenpaare am 3'-Ende des Templates amplifiziert. Als Primer wurden die Oligonucleotide Hae end ba (downstream) und Hae sub fo short 2 (upstream) benutzt. Als Kompetitor-DNA wurde das Template eingesetzt (0.1 pM), welches für das M.Hae III-ED-B-His tag Fusionsprotein kodiert. Mit den obigen Primern wird ausgehend von diesem Template ein 577 bp langes DNA Fragment amplifiziert. Nach der Amplifikation der selektierten Nukleinsäuren wurden die Proben auf ein Agarosegel (1.4 %) aufgetragen.

Das Agarosegel ist in Figur 5 gezeigt. In Spur 1 und 4 ist ein Grössenmarker geladen (Smart Ladder, Eurogentech). Die Bande knapp unter der 600 bp Markie-

5 rung ist das DNA Fragment, welches als Kompetitor zur PCR gegeben wurde. Die untere Bande stellt das 331 bp lange DNA Fragment dar, welches mit dem Enzym M.Hae III-His tag inkubiert worden war. In Spur 2 wurde das Experiment aufgetragen. In Spur 3 die Negativkontrolle ohne M.Hae-His tag. In Spur 5 wurde als quantitativer Vergleich 0.1 pM des 331 bp DNA Moleküls zur PCR Lösung gegeben. Spur 6 zeigt das Resultat der PCR nur mit Kompetitor-DNA (Negativkontrolle).

10 Beispiel 5

Expression von M.Hae-His tag und M.Hae-Flag tag Fusionspolypeptiden *in vitro* und anschliessende Selektion mittels Affinitätschromatographie.

15 Die Gene kodierend für M.Hae III-His tag (I) und M.Hae III-Flag (II) tag wurden gemäss dem Fachmann gängigem Verfahren in das Plasmid pIVEX 2.3d (Roche Applied Science, Schweiz) kloniert. Je 500 ng beider Plasmide wurden in 25 µl Transkriptions-/Translations-Mix (Roche Applied Science, Schweiz) während 2 h bei 30 °C inkubiert. Zusätzlich wurden lineare DNA Template (je 50 ng), welche für M.Hae III-His tag (III) und M.Hae III-Flag tag (IV) kodieren, ebenfalls in 25 µl
20 Transkriptions-/Translations-Mix während 2 h bei 30°C inkubiert. Die Expression der Polypeptide wurde mittels Western Blot überprüft (siehe auch Beispiel 3).

Zu den Proben I bis IV wurden 50 µl Puffer A (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 0.1 % Tween 20 (Fluka) pH = 8.0) gegeben. 20 µl Ni-NTA
25 Magnetic Agarose Beads (Qiagen, Cat. No. 36111) wurden zugegeben, und die Proben wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die magnetischen Ni-NTA Agarose Beads wurden mit Hilfe eines Magnetic Separators (MPC-S, Dynal, Norway) sechsmal mit 100 µl Puffer B (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 0.1 % Tween 20, pH = 8.0) gewaschen. Nach dem letzten Wasch-
30 gang wurden die Ni-NTA Magnetic Agarose Beads in 100 µl PBS resuspendiert. Mit 1 µl der gewaschenen Nickel-Beads wurde die Menge der verbliebenen mittels PCR analysiert.

Für die PCR wurden die Primer M.Hae Nco ba (downstream) und M.Hae Xho His fo (upstream) benutzt. Mit diesen Primern wird ein DNA Fragment von 1020 bp amplifiziert. Für die PCR wurde folgendes Temperaturprogramm benutzt:

94 °C (3 min.) → [94 °C (1 min.) → 55 °C (1 min.) → 72 °C (90 sec)]₂₅ Zyklen

5 → 72 °C (3 min.) → 4 °C.

Die PCR Proben I bis IV wurden zur Analyse auf ein Agarosegel (1.4 %) aufgetragen (vgl. Figur 6a und 6b).

- 10 Figur 6a zeigt das Selektionsexperiment mit der Plasmid-DNA als Template für die *in vitro* Transkription-/Translation. In der Spur ganz rechts (M) wurden 5 µl eines Grössenmarkers geladen (Smart Ladder, Eurogentech). In der ersten Spur (I) von links wurde die Probe geladen, in der das Plasmid, welches für M.Hae III-His tag codiert, für die *in vitro* Transkription-/Translation eingesetzt worden war.
- 15 In der mittleren Spur (II) wurde die Probe geladen, in der das Plasmid, welches für M.Hae III-Flag tag codiert, für die *in vitro* Transkription-/Translation eingesetzt worden war.

- 20 Figur 6b zeigt das Selektionsexperiment mit der linearen DNA als Template für die *in vitro* Transkription-/Translation. In der Spur ganz links (M) wurden 5 µl eines Grössenmarkers geladen (Smart Ladder, Eurogentech). In der mittleren Spur (III) wurde die Probe geladen, in der die lineare DNA, welche für M.Hae III-His tag codiert, für die *in vitro* Transkription-/Translation eingesetzt worden war.
- 25 In der rechten Spur (IV) wurde die Probe geladen, in der die lineare DNA, welche für M.Hae III-Flag tag codiert, für die *in vitro* Transkription-/Translation eingesetzt worden war.

- Aus den Intensitäten der DNA-Banden auf dem Agarosegel von Fig. 6a und Fig. 6b ist klar ersichtlich, dass mit M.Hae III-His tag-Fusionspolypeptid gekoppelte
- 30 DNA mit Nickel-Affinitätschromatographie selektiert und amplifiziert wurde, während DNA gekoppelt mit M.Hae III-Flag tag-Fusionspolypeptid den Selektionszyklus nicht überlebte.

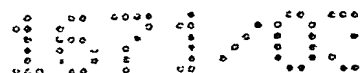
Bezugszeichenliste

- A Einschliessen der DNA-Bibliothek in Mikrokompartimente
- B Extrahieren der Emulsion
- 5 C Selektieren von Polypeptiden mit den best. Eigenschaften
- D Amplifizieren der gen Info. der geb. Polypeptide (PCR)
- E weiterer Selektionszyklus
- F Klonieren der kodierten Polypeptide
- III Transkription
- 10 IV Translation
 - 1 DNA-Bibliothek
 - 2 DNA Molekül
 - * chemische Gruppe, Suicide Inhibitor
 - 3A Wasser-in-Öl Emulsion
 - 15 3B Wasserkompartiment
 - 4 Sammlung von DNA-Polypeptid-Fusionen, Polypeptid-DNA Komplexen
 - 5 Fusionspolypeptide,
 - 5A konstantes Teilpeptid I
 - 5B variables Teilpeptid II
 - 20 6 DNA-Polypeptid-Fusion bzw. Polypeptid-DNA Komplex
 - 7 gebundene Polypeptide
 - 8 immobilisierte Zielmoleküle
 - 9 neue Sammlung von Genen
 - 10 mRNA

25

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur *in vitro* Evolution von Polypeptiden, welches folgende Verfahrensschritte umfasst:
- 10 a) Bereitstellen einer Bibliothek (1) aus Nukleinsäuren (2);
- b) Kompartimentierung dieser Nukleinsäuren (2) in einer Wasser-in-Öl Emulsion (3A) zusammen mit einem *in vitro* Transkriptions-Translations-Mix;
- 15 c) *In vitro* Expression von durch diese Nukleinsäuren (2) kodierten Fusionspolypeptiden (5) in Mikrokompartmenten (3B) der Wasser-in-Öl Emulsion (3A);
- d) Herstellen einer Sammlung (4) von Fusionspolypeptid-Nukleinsäure-Komplexen (6), wobei jedes Nukleinsäuremolekül (2) an dasjenige Fusionspolypeptid (5) gebunden wird, für welches es kodiert;
- 20 e) Extrahieren der Fusionspolypeptid-Nukleinsäure-Komplexe (6) aus der Wasser-in-Öl Emulsion (3A);
- f) Selektieren der Fusionspolypeptid-Nukleinsäure-Komplexe (6) mit bestimmten Eigenschaften;
- 25 g) Amplifizieren der selektierten Nukleinsäuremoleküle;
- dadurch gekennzeichnet, dass**
- die Fusionspolypeptide (5) je ein konstantes Teilpeptid I (5A) und ein variables Teilpeptid II (5B) umfassen, wobei die Fusionspolypeptide (5) über ein Teilpeptid I mit der Nukleinsäure (2) kovalent gekoppelt werden, und wobei die Anzahl der kovalent an eine Nukleinsäure (2) gekoppelten Fusionspolypeptide (5) in Einerschritten definierbar ist.
- 30 2. Verfahren gemäss Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** jedem Mikrokompartment (3B) der Wasser-in-Öl Emulsion (3A) höchstens eine Nukleinsäure (2) zugeordnet wird.



3. Verfahren gemäss Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** jeweils genau ein Teilpeptid I (5A) über eine kovalente Bindung mit einem Nukleinsäuremolekül (2) verbunden wird.
- 5 4. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** das konstante Teilpeptid I (5A) ein Enzym ist, welches aus der Gruppe der Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen ausgewählt wird.
- 10 5. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Teilpeptid I (5A) direkt an ein unverändertes Nukleinsäuremolekül (2) oder an ein modifiziertes Nukleinsäuremolekül (2*) gebunden wird.
- 15 6. Verfahren gemäss Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Modifikation des Nukleinsäuremoleküls (2*) als Suicide Inhibitor wirkt.
7. Verfahren gemäss Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Suicide Inhibitor (*) innerhalb der Nukleinsäuresequenz oder am 5'-Ende
20 oder am 3'-Ende der Nukleinsäure (2) angeordnet ist.
8. Verfahren gemäss einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** das konstante Teilpeptid I (5A) des Fusionspolypeptids (5) eine (Cytosin-5)-Methyltransferase ist.
- 25 9. Verfahren gemäss Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** die (Cytosin-5)-Methyltransferase die Hae III Methyltransferase aus *Haemophilus aegypticus* ist.
- 30 10. Verfahren gemäss Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** die modifizierte Nukleinsäure (2*) den Suicide Inhibitor für die Hae III Methyltransferase mit der Sequenz (5'-GGFC-3') enthält, wobei F für 5-Fluorodeoxycytidin steht.

11. Verfahren gemäss einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** das variable Teilpeptid II (5B) des Fusionspolypeptids ein Peptid, ein Antikörper, ein Antikörperfragment oder ein beliebiges Protein ist.
- 5
12. Verfahren gemäss einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** Mikrokompartimente in der Wasser-in-Öl Emulsion (3A) hergestellt werden, welches Wasserkompartimente (3B) mit einem Durchmesser zwischen 1 µm und 2 µm sind.
- 10
13. Verwendung von gemäss einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche selektierten, an ein bestimmtes Zielmolekül (8) bindenden Polypeptiden für biotechnologische und/oder diagnostische und/oder präventive und/oder therapeutische Zwecke.
- 15
14. Verwendung von gemäss einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 12 selektierten, an ein bestimmtes Zielmolekül (8) bindenden Polypeptiden für die Herstellung von Medikamenten.
- 20
15. Polypeptide, die gemäss einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 12 selektiert worden sind und an ein bestimmtes Zielmolekül (8) binden.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Evolution von Polypeptiden, wobei der Prozess der Evolution vollständig *in vitro* stattfindet. Das Verfahren ermöglicht die Isolierung von Polypeptiden mit definierten Eigenschaften aus einer sehr grossen Sammlung (1) von Polypeptid-Varianten. Bei dem Verfahren werden in einem ersten Schritt Polypeptide (Phänotyp) in einer Wasser-in-Öl Emulsion (3A) exprimiert und kovalent an deren kodierende Nukleinsäure (2) gekoppelt. In einem zweiten Schritt werden die Polypeptide-Nukleinsäure Fusionen (4) mit definierten Eigenschaften selektiert. Die Fusionspolypeptide (5) umfassen je ein konstantes Teilpeptid I (5A) und ein variables Teilpeptid II (5B), wobei die Fusionspolypeptide über das Teilpeptid I mit der Nukleinsäure (2) kovalent gekoppelt werden. Das Verfahren ermöglicht die Kopplung einer definierten Anzahl Fusionspolypeptide (5) an eine Nukleinsäure (2) bzw. an ein modifiziertes Nukleinsäuremolekül (2*).

(Fig. 1)

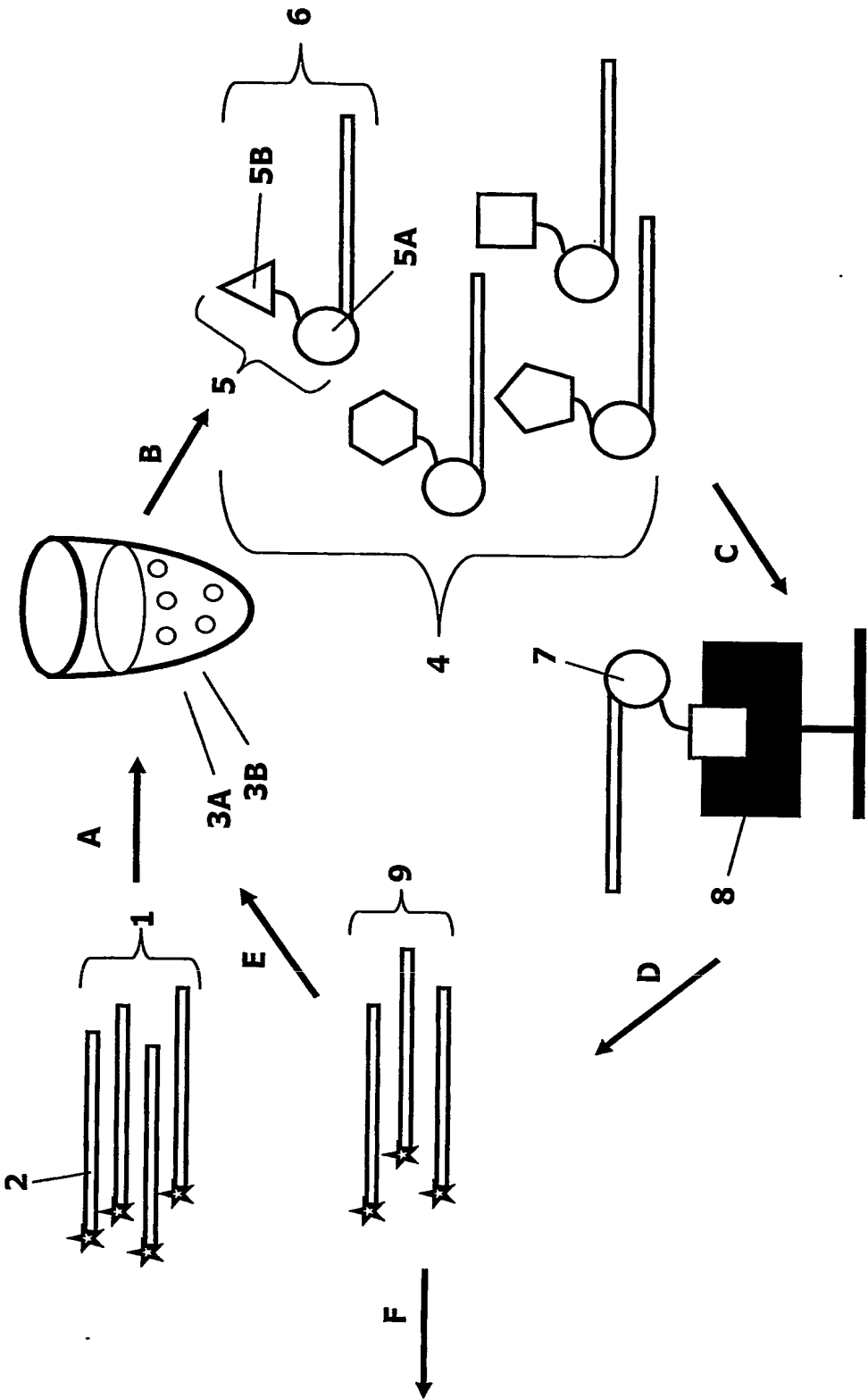


Fig. 1

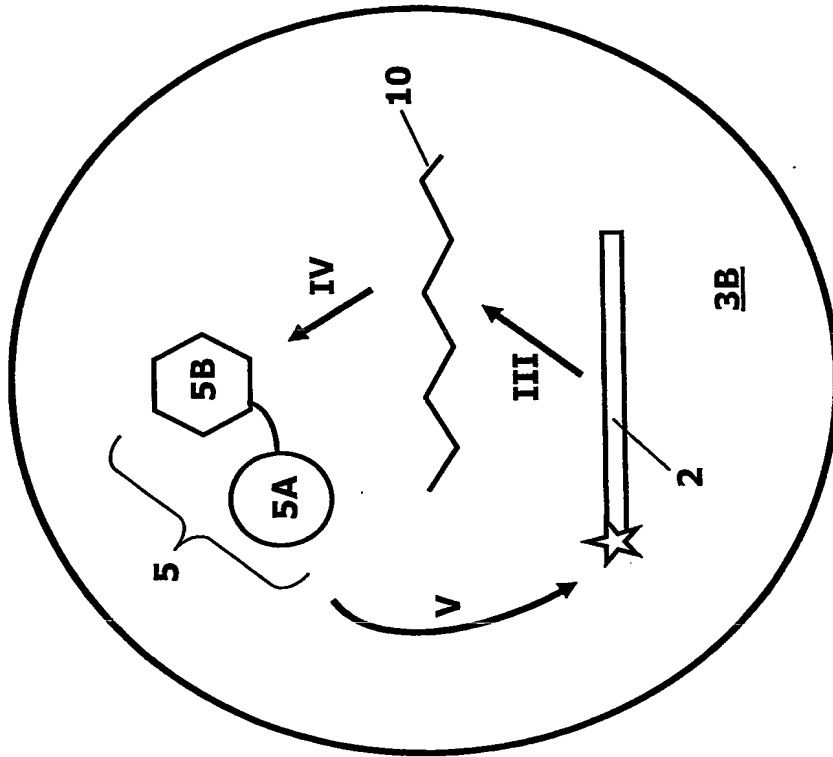


Fig. 2

Fig. 3B

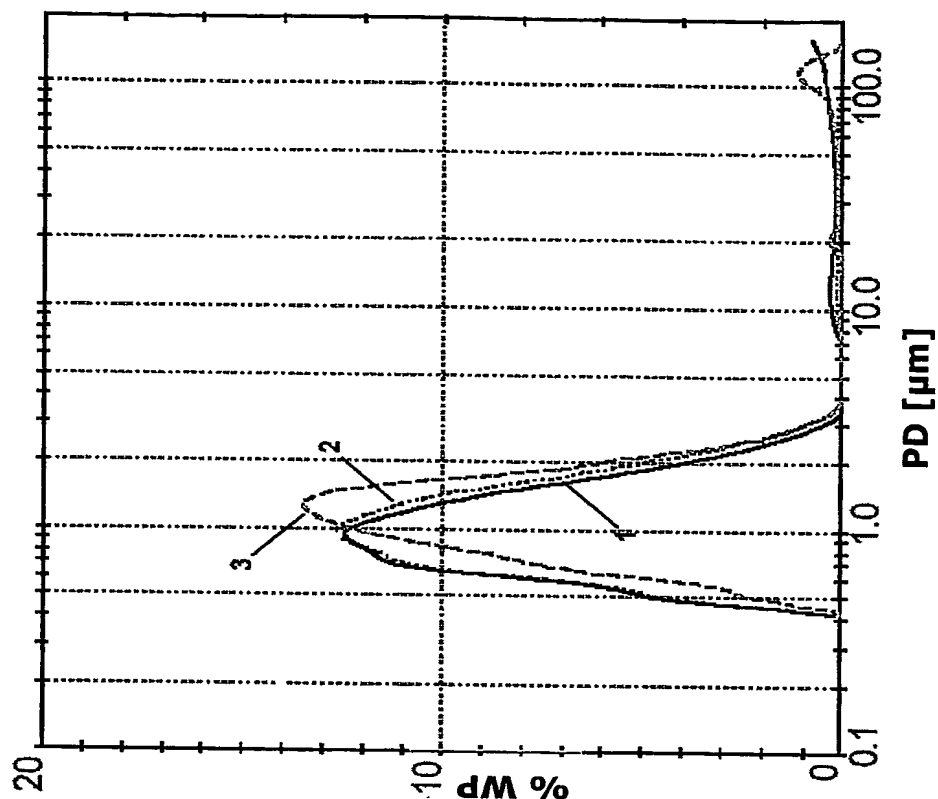


Fig. 3a

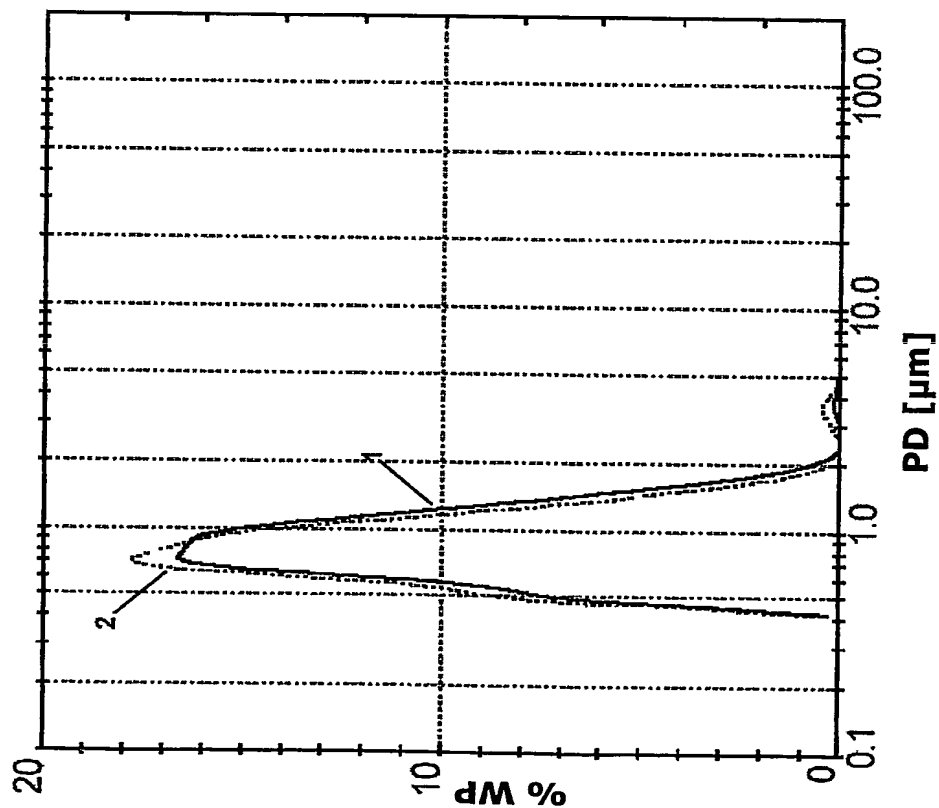


Fig. 5

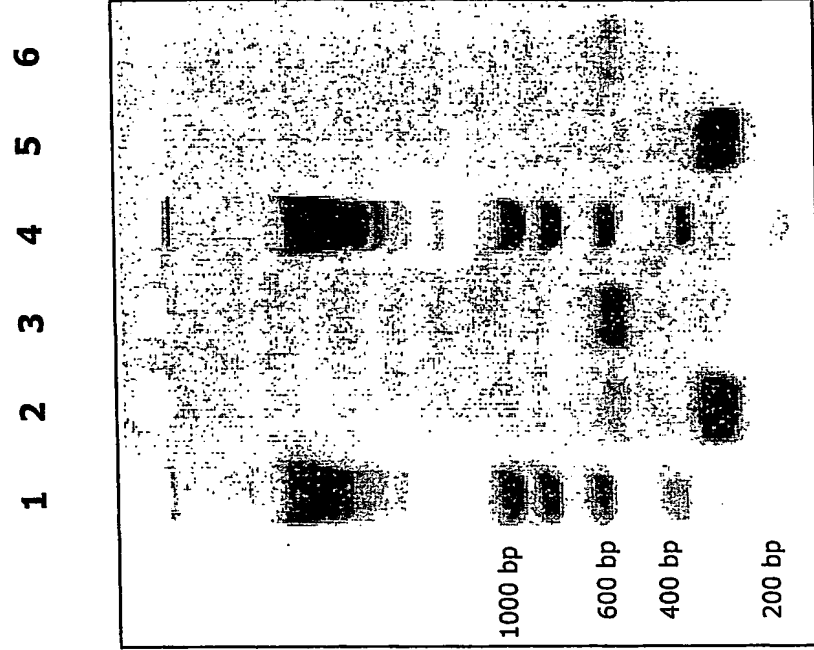


Fig. 4

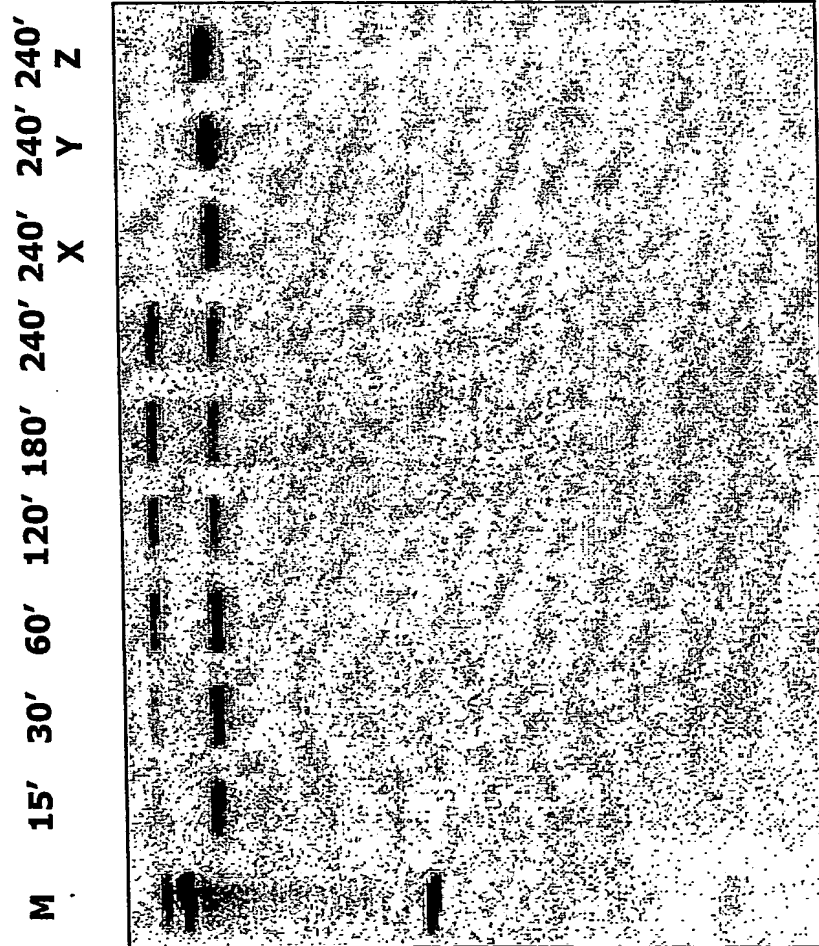


Fig. 6b

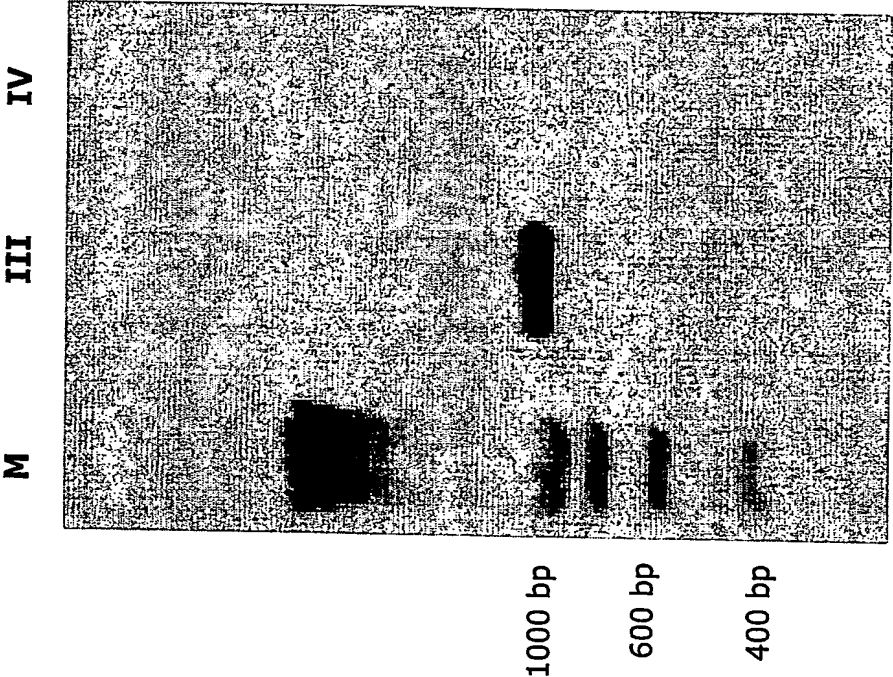
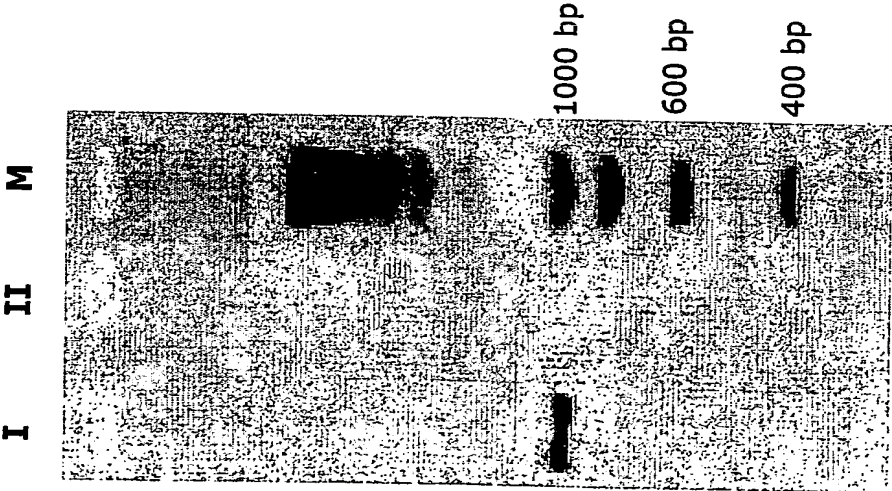


Fig. 6a



PCT/CH2004/000610



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.